7 月 July
2020, 63(7): 798 - 806
昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA
http://www.insect.org.cn
doi: 10.16380/j.kcxb.2020.07.003

家蚕丝氨酸蛋白酶抑制剂 Bmserpin2 对酚氧化酶原激活和抗菌肽基因表达的抑制作用

李 冰[1,2], 孙 帆[2], 陶姗姗[2], 夏家凤[2], 叶崇军[2,*]

(1. 农业部蚕桑遗传改良重点实验室, 江苏镇江 212018; 2. 安徽省农业科学院蚕桑研究所, 合肥 230061)

摘要:【目的】丝氨酸蛋白酶抑制剂家族蛋白是昆虫中调控自身免疫反应的重要蛋白酶抑制剂,本研究旨在研究家蚕 *Bombyx mori* 丝氨酸蛋白酶抑制剂 2(Bmserpin2)在家蚕 2 个重要的自身免疫通路即酚氧化酶原(prophenol oxidase, PPO)激活通路和革兰氏阳性菌诱导抗菌肽的 TOLL 通路中的调控作用。【方法】PCR 扩增家蚕 *Bmserpin2* 基因片段后原核表达并通过镍柱纯化。利用纯化后的重组 Bmserpin2 蛋白分别与胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、弹性蛋白酶和蛋白酶 K 反应,检测 Bmserpin2 对上述蛋白酶活性的影响。通过 RT-qPCR 检测 *Bmserpin2* 在家蚕 5 龄第 3 天幼虫头、中肠、脂肪体、血淋巴、丝腺和表皮组织中表达的模式。往家蚕 5 龄第 3 天幼虫注射 Bmserpin2 重组蛋白,检测 Bmserpin2 对其血淋巴中 PPO 活性的影响。通过滕黄微球菌 *Micrococcus luteus* 诱导家蚕 5 龄第 3 天幼虫产生抗菌肽并注射 Bmserpin2 重组蛋白后,RT-qPCR 检测其血淋巴中抗菌肽基因 *gloverin2* 和 *moricin* 表达量。【结果】成功构建重组质粒并表达纯化目的蛋白 Bmserpin2。通过与不同蛋白酶反应得出 Bmserpin2 可极显著抑制消化酶胰蛋白酶和弹性蛋白酶活性,对胰凝乳蛋白酶和蛋白酶 K 活性影响不显著,提示 Bmserpin2 对不同蛋白酶具有生物学活性和催化特异性。基因表达模式显示 *Bmserpin2* 在家蚕 5 龄幼虫血淋巴和脂肪体中表达量最高。家蚕 5 龄幼虫注射重组 Bmserpin2 蛋白后发现目的蛋白能有效抑制血淋巴中 PPO 活性。利用滕黄微球菌诱导家蚕 5 龄幼虫产生抗菌肽后,滕黄微球菌和 Bmserpin2 混合注射组中血淋巴中抗菌肽基因 *gloverin2* 和 *moricin* 的转录表达与只注射滕黄微球菌的比较被显著下调。【结论】Bmserpin2 可能参与家蚕酚氧化酶原激活和 TOLL 途径的胞外级联反应的免疫通路。

关键词: 家蚕; 自身免疫; 丝氨酸蛋白酶抑制剂; 酚氧化酶原; 抗菌肽; TOLL 通路

中图分类号: Q78　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 0454-6296(2020)07-0798-09

Inhibition of the activation of prophenol oxidase and the expression of antimicrobial peptide genes by the serine protease inhibitor Bmserpin2 in *Bombyx mori*

LI Bing[1,2], SUN Fan[2], TAO Shan-Shan[2], XIA Jia-Feng[2], YE Chong-Jun[2,*] (1. Key Laboratory of Silkworm and Mulberry Genetic Improvement, Ministry of Agriculture, Zhenjiang, Jiangsu 212018, China; 2. Sericultural Research Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230061, China)

Abstract:【Aim】Serine protease inhibitor family proteins are important protease inhibitors that regulate the autoimmune response in insects. This study aims to investigate the regulatory role of Bmserpin2 in two

基金项目: 农业部蚕桑遗传改良重点实验室开放课题(KL201703); 安徽省农业科学院创新团队项目(2020YL044); 现代农业产业技术体系建设专项(CASR-22)

作者简介: 李冰, 男, 1986 年 6 月生, 湖北黄冈人, 硕士, 助理研究员, 研究方向为家蚕分子生物学, E-mail: libing2504@sina.com

[*] 通讯作者 Corresponding author, E-mail: yechj1983@163.com

收稿日期 Received: 2019-09-30; 接受日期 Accepted: 2019-11-30

important autoimmune pathways, *i. e.*, the prophenol oxidase (PPO) activation pathway and the TOLL pathway of antimicrobial peptides (AMPs) induced by gram-positive bacteria, in *Bombyx mori*. 【Methods】*Bmserpin*2 gene fragment of *B. mori* was amplified by PCR, and the target protein expression was induced by prokaryotic expression system and purified by nickel column. The effect of Bmserpin2 on the activities of trypsin, chymotrypsin, elastase and protease K was determined after the reaction between the purified recombinant Bmserpin2 and the above proteases, respectively. The expression patterns of *Bmserpin*2 in the head, midgut, fat body, hemolymph, silk gland, and integument of the day-3 5th instar larvae of *B. mori* were detected by RT-qPCR. The recombinant Bmserpin2 was injected into the day-3 5th instar larvae of *B. mori*, and the effect of Bmserpin2 on the PPO activity in their hemolymphs was determined. After the day-3 5th instar larvae of *B. mori* was induced by *Micrococcus luteus* to produce antimicrobial peptides (AMP) and injected with Bmserpin2, the expression levels of AMP genes *gloverin*2 and *moricin* in their hemolymphs were detected by RT-qPCR. 【Results】The recombinant plasmid was successfully constructed, and the target protein Bmserpin2 was expressed and purified. Bmserpin2 significantly inhibited the activities of trypsin and elastase, but had no significant effect on the activities of chymotrypsin and proteinase K, suggesting that Bmserpin2 has biological activity and catalytic specificity to different proteases. The expression levels of *Bmserpin*2 were the highest in the hemolymph and fat body of the 5th instar larvae of *B. mori*. Most importantly, Bmserpin2 was found to inhibit the PPO activity in the hemolymph of the 5th instar larvae of *B. mori* after injection of the recombinant Bmserpin2. AMP was produced in the 5th instar larvae of *B. mori* induced by *M. luteus*. The transcription levels of AMP genes *gloverin*2 and *moricin* in the hemolymph in the Bmserpin2 and *M. luteus* mixedly injected group was significantly down-regulated as compared with that in the *M. luteus* injected group. 【Conclusion】Bmserpin2 may be involved in the immune pathway of the activation of PPO and the extracellular cascade reaction of TOLL pathway in *B. mori*.

Key words: *Bombyx mori*; autoimmune; serine protease inhibitor; prophenol oxidase; antimicrobial peptide; TOLL pathway

丝氨酸蛋白酶级联反应被丝氨酸蛋白酶抑制剂(serine protease inhibitor, serpin)精确调控(Kanost, 1999; Gubb *et al*., 2010)。Serpin 家族几乎存在于所有的生物中,拥有多种初级结构形态,且具有保守的结构域,是一种普遍存在的具有亲核丝氨酸残基催化位点的酶。该家族的大多数成员的蛋白质由 400~500 个氨基酸组成,包含一个连接 β 折叠结构域 A 和 C 的 C 末端暴露的反应中心环(reactive center loop, RCL)。对 serpin 家族部分成员参与丝氨酸蛋白酶级联反应的精细调控已有许多研究,显示这些家族成员参与调控的靶点和机制不尽相同,但它们的作用方式主要是通过蛋白互作和限制性蛋白水解实现对靶标蛋白的调节功能(Jiang *et al*., 2005; Tripathi and Sowdhamini, 2008)。

Serpin 基因在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (Reichhart, 2005)、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* (Suwanchaichinda and Kanost, 2009)、家蚕 *Bombyx mori*(Zou *et al*., 2009)和棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Xiong *et al*., 2015)等昆虫中相继被鉴定。在家蚕中,34 个 serpin 基因目前已经注释鉴定了,并检测了它们在微生物刺激下的表达模式(Zou *et al*., 2009)。近期研究表明家蚕 serpin15 能够被球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 和藤黄微球菌 *Micrococcus luteus* 诱导,负调控酚氧化酶原(prophenol oxidase, PPO)反应和 TOLL 通路(Liu *et al*., 2015)。Serpin5 通过靶向细胞中的 BmHP6 和 BmSP21 下调 TOLL 和 PPO 通路(Li *et al*., 2016)。家蚕 Bmserpin6 蛋白可能在家蚕的酚氧化酶原激活以及抗菌肽表达过程中发挥负调节作用(李冰等, 2016),可能参与蛋白酶介导的家蚕先天免疫方面的调控(Li *et al*., 2017)。查宏贤等(2011)克隆了家蚕 *serpin*4 基因并进行了原核表达和抗体制备。家蚕 Bmserpin2 在 1993 年通过克隆表达鉴定,证实是一类抗凝胰乳蛋白酶(Narumi *et al*., 1993),并且在血淋巴和丝腺中基因转录表达量较高(Yonemura *et al*., 2012)。但是目前对其生物学功能,特别是参与昆虫天然免疫

方面的功能尚不明确。本研究通过原核表达系统得到纯化的重组 Bmserpin2 蛋白,并通过家蚕体内实验,结合 RT-qPCR 和酶活性测定等生物学方法,分析 Bmserpin2 的催化作用以及在家蚕自身免疫通路中的调控作用。

1 材料与方法

1.1 材料与主要试剂

实验中家蚕品种为大造,保存于安徽省农业科学院蚕桑研究所家蚕品种资源库,幼虫期在 25 ± 1℃温度下用新鲜桑叶饲养。实验中脂肪体、血淋巴、头等组织取自家蚕 5 龄第 3 天幼虫,收集后立即在液氮中快速冷冻,保存于 -80℃备用。

革兰氏阳性菌藤黄微球菌购自 Sigma 公司,Trizol 购自 Invitrogen 公司,胰蛋白酶(trypsin)、胰凝乳蛋白酶(chymotrypsin)、弹性蛋白酶(elastase)、蛋白酶 K(protease K)购自上海生工生物工程技术服务有限公司,分子克隆中所用的试剂、cDNA 合成试剂盒、荧光定量试剂盒等购自 TaKaRa 公司,GST Fusion Protein Spin Purification Kit 购自金斯瑞公司。

1.2 家蚕组织的总 RNA 抽提及 cDNA 合成

取家蚕 5 龄第 3 天幼虫(10 头)在冰上进行解剖,收集脂肪体、血淋巴、头、中肠、丝腺和表皮组织提取 RNA,加入1 mL Trizol,混匀后加入 200 mL 氯仿,混匀后冰上静置 5 min, 4℃ 12 000 r/min 离心 15 min;取上清液 500 μL,加入 500 μL 异丙醇,充分混匀后冰上放置 10 min,4℃ 12 000 r/min 离心 15 min;移出上清,用 DEPC 水配制的 75% 乙醇洗涤沉淀 3 次,通风厨内晾干后用适量 DEPC 水溶解沉淀,并用紫外分光光度计测定 A_{260}/A_{280}来确定纯度和浓度,-80℃下保存备用。

使用 TaKaRa 公司 First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒进行 cDNA 第 1 链的合成,反应体系:5×RT Buffer 1 μL, dNTPs 2 μL, RNase Inhibitor 1 μL, Oligo dT Primer 2 μL, Rever-Tra Ace 1 μL, 总 RNA 1 μg,加 DEPC 水至总体积为 20 μL。PCR 反应程序:37℃ 15 min, 85℃ 5 s, 4℃ 保存。以 cDNA 为模板扩增内参引物 BmActinA3,检测合成 cDNA 质量,余下的置于 -20℃保存。

1.3 Bmserpin2 基因克隆

根据从 NCBI 数据库家蚕 *Bmserpin2* 基因序列(GenBank 登录号:XM_012692302.2),采用 Premier 5.0 软件设计引物,上海生工生物工程技术服务有限公司合成(表 1)。以家蚕血淋巴组织 cDNA 为模板进行目的基因的 PCR 扩增克隆。PCR 反应体系(10 μL):2×All-in-One PCR Mix 5 μL, 正反向引物(0.2 μmol/L)各 1 μL, cDNA 1 μL, H_2O 2 μL。PCR 扩增程序:95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 90 s, 重复 35 个循环;最后 72℃ 10 min, 4℃保存。通过琼脂糖凝胶电泳进行胶分离回收,回收产物连接 pMD18-T 载体,阳性克隆送生工生物工程(上海)股份上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

表 1 实验所用引物

Table 1 Primers used in the experiment

引物 Primer	序列 (5′-3′) Primer sequence	引物用途 Primer usage
Bmserpin2-F	GGGTTT<u>CATATG</u>GATTCAAAGGCTTTATCCTC	原核表达 Prokarytic expression
Bmserpin2-R	CCG<u>CTCGAG</u>ATTTCGTCCACGGTATTGGCC	
Bmserpin2-F	ACTGATCCTGCACACGAAGA	RT-qPCR
Bmserpin2-R	CACAGCCGAGAATGATGAGC	
gloverin2-F	GCACTTTGGGACAAAACGAT	
gloverin2-R	TGGCTTGTGCATTCTTGTTC	
moricin-F	TGTGGCAATGTCTCTGGTGT	
moricin-R	GCTTTCTTTTCTTCGGTTTCAA	
BmActinA3-F	AACACCCCGTCCTGCTCACTG	RT-qPCR 中内参基因扩增 Amplification of internal reference gene in RT-qPCR
BmActinA3-R	GGGCGAGACGTGTGATTTCCT	

下划线序列分别为 *Nde* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ酶切位点。The underlined sequences are the restriction sites of *Nde* Ⅰ and *Xho* Ⅰ, respectively.

1.4 重组蛋白 Bmserpin2 诱导表达

测序正确后,用 *Nde* Ⅰ和 *Not* Ⅰ对 1.3 节构建的 pMD18-T-*serpin2* 进行双酶切,将产物连接到 pET-28a(+)中,筛选阳性克隆并通过测序进行鉴定。

将重组质粒转入 BL21 感受态细胞进行培养，挑选阳性克隆在卡那霉素的 LB 液态培养基中 37℃震荡培养 12 h；取上述菌液以体积 1∶100 加入到含卡那霉素的 LB 培养基中，37℃震荡培养至菌液 $OD_{600} \approx 1$；加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L，继续培养 6 h 后使用 12% SDS-PAGE 检测重组蛋白表达情况。

1.5　重组蛋白 Bmserpin2 纯化及 Western blot 鉴定

目的蛋白大量诱导后收集菌液，4℃条件下 5 000 r/min离心 15 min，去除上清，用浓度为 10 mmol/L、pH 为 7.4 的 Tris 溶液清洗细胞。4℃条件下 5 000 r/min 离心 15 min，弃上清；以每 100 mL 诱导后菌液加入 4 mL 浓度为 10 mmol/L Tris 的比例重悬，冰上静置 30 min；将重悬的沉淀置于冰上超声破碎，然后 4℃ 12 000 r/min 离心 10 min，取上清。按照 GE 公司 GST Fusion Protein Spin Purification Kit 说明书，镍柱亲和结合 30 min；10 mmol/L 咪唑洗杂蛋白，以 100，200，300，400 和 500 mmol/L 浓度的咪唑洗脱目的蛋白。

取纯化后的蛋白质样品进行 12% SDS-PAGE 检测。40 mA 恒流下转膜 80 min，用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液封闭 1 h。加入一抗（Anti-6 × His rabbit polyclonal an-tibody）孵育 1 h，加入二抗孵育 1 h，其中压片显色用二抗为羊抗兔 IgG-HRP，膜上直接显色二抗为羊抗兔 IgG-AP，进行 Western blot 鉴定。

1.6　重组蛋白 Bmserpin2 生物学活性测定

为探讨 Bmserpin2 蛋白的生物学功能，将 1.5 节纯化定量后的 Bmserpin2 蛋白分别与胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、弹性蛋白酶、蛋白酶 K 进行孵育，以检测 Bmserpin2 对不同种类蛋白酶的抑制效果，从而确定其生物学活性。

分别取不同蛋白酶各 1 μg，不做任何处理，作为对照组；实验组分别按照 Bmserpin2 蛋白与蛋白酶质量比 1∶1和 1∶2加入 Bmserpin2 蛋白，用 PBS 缓冲液将混合后体积定量至 15 μL，冰上孵育 10 min，加入浓度为 5 mg/mL 的 Azocasein 的底物 185 μL。上述混合液 37℃水浴处理 20 min 后加入 TCA 60 μL 终止反应；然后 10 000 r/min 离心 3 min，吸取上清 200 μL 加入等体积浓度为 1 mmol/mL 的 NaOH 显色 10 min，分光光度计检测 OD_{436}值。

1.7　*Bmserpin2* 基因在家蚕幼虫不同组织中分布情况测定

分别抽提家蚕 5 龄第 3 天幼虫的头、中肠、脂肪体、血淋巴、丝腺和表皮组织 RNA 并合成 cDNA，利用 RT-qPCR 检测 *Bmserpin2* 在上述组织中的表达分布情况，以 *BmActinA3* 为内参基因。RT-qPCR 引物序列见表 1，根据荧光定量试剂盒的说明书操作，使用 Bio-Rad 公司生产的荧光定量 PCR 仪进行反应：95℃变性 30 s；95℃ 50 s，60℃ 30 s，40 个循环。每一样品进行 3 次独立的生物学重复，每个生物学重复来自 10 头个体。

1.8　重组蛋白 Bmserpin2 对家蚕幼虫血淋巴中酚氧化酶原活性的影响

将家蚕 5 龄第 3 天幼虫冰上放置 20 min 后，注射纯化的 Bmserpin2 蛋白 1.5 g，设置不做任何处理和注射等量 PBS 缓冲液的家蚕 5 龄第 3 天幼虫分别作空白和阴性对照组。注射 6 h 后，每组取 5 头幼虫取 5 mL 血淋巴，加入 45 mL PBS 缓冲液进行稀释，取 10 mL 稀释的血淋巴加入浓度为 10 mmol/mL 的多巴胺溶液 200 mL，室温下测定 OD_{490} 值，参考 Amparyup 等（2009）及 Sumathipala 和 Jiang（2010）的方法测定酚氧化酶原的酶活性，每组进行 3 次独立重复实验。进一步进行 Western blot 分析，方法同 1.5 节。

1.9　重组蛋白 Bmserpin2 对家蚕幼虫血淋巴中抗菌肽基因表达的影响

已有文献报道家蚕中 serpin 蛋白与 TOLL 通路调控相关（Levashina *et al*.，1999；Fullaondo *et al*.，2011），并且抗菌肽基因 *gloverin2*（GenBank 登录号：692527）和 *moricin*（GenBank 登录号：692365）常用于研究外源刺激下家蚕自身免疫免疫（Li J *et al*.，2016；Li B *et al*.，2017）。为研究 Bmserpin2 是否也存在同样的生物学功能，以未做任何处理的家蚕作为空白对照，以注射革兰氏阳性菌滕黄微球菌的家蚕作为阳性对照，以注射滕黄微球菌和重组蛋白 Bmserpin2 混合物作为实验组进行研究，用 RT-qPCR 的方法检测 Bmserpin2 对家蚕血淋巴中抗菌肽基因 *gloverin2* 和 *moricin* 表达的影响。

将家蚕 5 龄第 3 天幼虫冰上放置 20 min 后，设 3 组实验：不做任何处理的空白对照组；注射滕黄微球菌 20 μL（0.1 μg/μL）和重组蛋白 10 μg 混合物的实验组；注射滕黄微球菌 20 μL（0.1 μg/μL）和 PBS 的阳性对照组。注射 1 h 后取血淋巴，参照 1.2 节方法制备 cDNA 模板用于 RT-qPCR，以 *BmActinA3* 为内参基因。反应体系（10 μL）：cDNA 1 μL，SYBR Premix Ex Taq^{TM} Ⅱ 5 μL，上下游引物（10 μmol/L）各 0.5 μL，超纯水 3 μL，混匀，离心，放入荧光定量 PCR 仪中进行扩增。反应条件：95℃预

变性 30 s; 95℃变性 50 s, 60℃退火 30 s, 72℃延伸 10 s,共 40 个循环。

1.10 数据分析

使用 EXCEL 整理实验数据,荧光定量结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$法进行数据处理。采用 SPSS 20.0 进行方差分析,采用 Duncan 氏多重比较检验法和 T 检验进行比较,分析目的基因的表达量及不同实验组数据之间差异显著性,其中 $P<0.05$ 表示样本间存在显著差异,$P<0.01$ 表示样本间存在极显著差异。

2 结果

2.1 重组蛋白 Bmserpin2 的表达纯化

通过大肠杆菌原核表达系统对目的蛋白进行体外表达,并通过镍柱进行亲和纯化得到目的蛋白 Bmserpin2。通过不同浓度的咪唑洗脱目的蛋白发现,100 ~ 300 mmol/L 咪唑即可将大部分目的蛋白洗脱(图 1: A)。根据 Bmserpin2 基因克隆测序结果,软件(http://www.bioinformatics.org/sms/prot_mw.html)预测目的蛋白 Bmserpin2 大小为 42.76 kD。根据考马斯亮蓝染色和 Western blot 的结果分析,纯化后蛋白为 6 × His 融合蛋白,约为 45 kD(图 1: B)。

2.2 重组蛋白 BmSerpin2 对不同蛋白酶的生物学活性

结果显示 Bmserpin2 蛋白对于消化酶胰蛋白酶(图 2: A)和弹性蛋白酶(图 2: C)有极显著的抑制效果($P<0.01$),而对胰凝乳蛋白酶(图 2: B)和蛋白酶 K(图 2: D)影响效果不显著,表明 Bmserpin2 蛋白对不同蛋白酶具有生物学活性并且表现出催化特异性。

2.3 *Bmserpin2* 基因在家蚕幼虫不同组织中的表达

结果如图 3 所示,*Bmserpin2* 在家蚕血淋巴中表达量最高($P<0.05$),其次是在脂肪体中,均达到头部中表达量的 20 倍左右,而中肠和丝腺组织中表达量也达到头部中表达量的 5 倍左右,表皮中的表达量最低。

2.4 重组蛋白 Bmserpin2 对家蚕幼虫血淋巴中酚氧化酶原活性的影响

图 4(A)中的结果表明,家蚕 5 龄幼虫血淋巴中 PPO 活性在注射重组 Bmserpin2 蛋白后,较未做任何处理的空白对照组和注射 PBS 的阴性对照组的显著性降低($P<0.05$),为空白对照组的 1/4 左右,而空白对照组和阴性对照组间差异不显著($P>0.05$)。观察不同处理组血淋巴颜色发现,实验组血淋巴黑化程度明显较对照组低(图 4: C)。进一步通过 Western blot 分析,结果如图 4(B)所示,推测 Bmserpin2 蛋白在家蚕血清中并未与血清中的丝氨酸蛋白酶形成稳定复合物。

2.5 重组蛋白 Bmserpin2 对家蚕幼虫血淋巴中抗菌肽基因表达的影响

结果如图 5 所示,注射滕黄微球菌和 PBS 的阳性对照组较空白对照组抗菌肽基因 *gloverin2* 和 *moricin* 表达上调,而注射滕黄微球菌和 Bmserpin2 混合物的实验组中 *gloverin2*(图 5: A)和 *moricin*(图 5: B)的 mRNA 水平显著性下调($P<0.05$)。这一结果表明,Bmserpin2 可能抑制了微球菌对抗菌肽的上调作用。

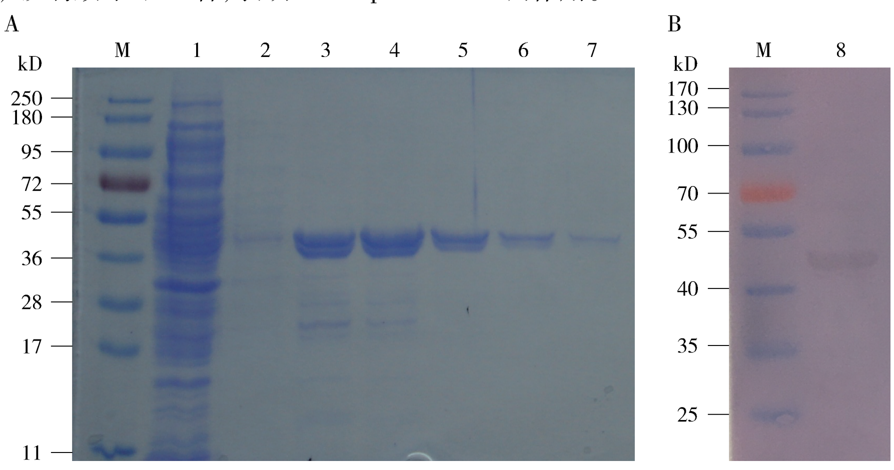


图 1 原核表达与纯化重组蛋白 Bmserpin2 的 SDS-PAGE 检测(A)及 Western blot 分析(B)

Fig. 1 SDS-PAGE (A) and Western blot assay (B) of the recombinant Bmserpin2 after prokaryotic expression and purification

M: 蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker; 1: 经 IPTG 诱导的 BL21 菌裂解液 BL21 bacteria lysate induced by IPTG; 2: 洗涤液 Washing solution; 3 - 7: 分别为 100, 200, 300, 400 和 500 mmol/L 咪唑洗脱的 Bmserpin2 蛋白的蛋白质溶液 Protein solution of Bmserpin2 eluted by 100, 200, 300, 400, and 500 mmol/L imidazole, respectively; 8: 目的蛋白的 His 抗体检测 Detection of His antibody to the target protein.

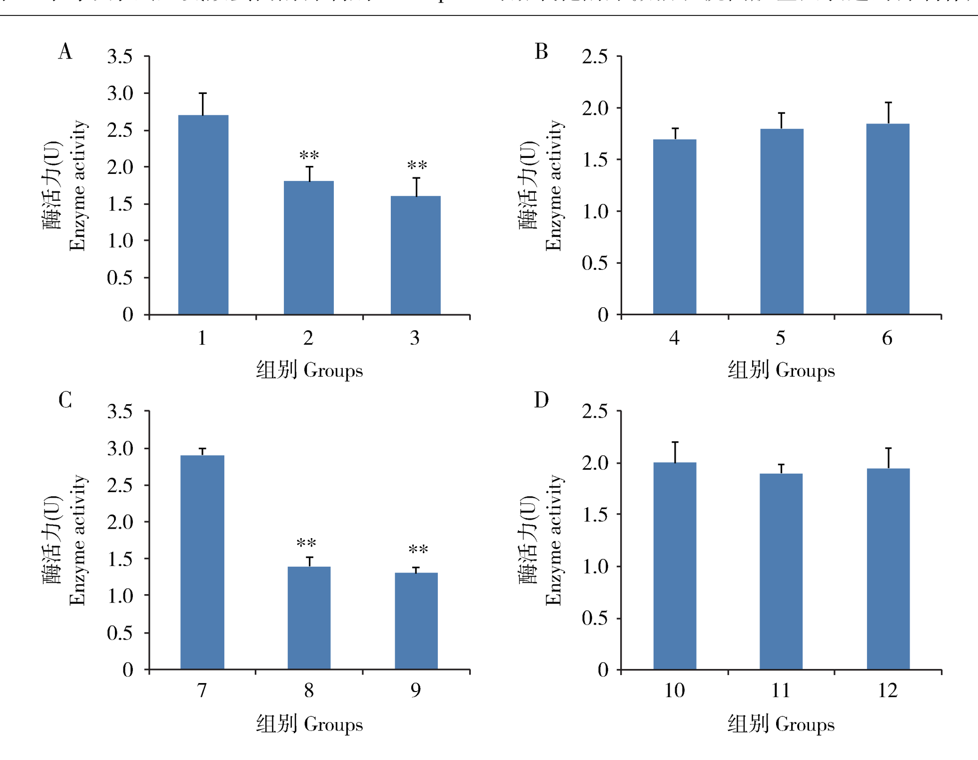


图 2　家蚕重组蛋白 Bmserpin2 对胰蛋白酶(A)、胰凝乳蛋白酶(B)、弹性蛋白酶(C)和蛋白酶 K(D)活性的影响

Fig. 2　Effects of the recombinant Bmserpin2 of *Bombyx mori* on the activities of trypsin (A), chymotrypsin (B), elastase (C) and proteinase K (D)

1, 4, 7, 10：分别为未加 Bmserpin2 的胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、弹性蛋白酶、蛋白酶 K 对照组 Control groups of trypsin, chymotrypsin, elastase and proteinase K, respectively, with no Bmserpin2 added; 2, 5, 8, 11：分别为 Bmserpin2 与胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、弹性蛋白酶和蛋白酶 K 以 1∶1质量比加入的处理组 Treatment groups with Bmserpin2 and trypsin, chymotrypsin, elastase and proteinase K added in 1∶1 mass ratio, respectively; 3, 6, 9, 12：分别为 Bmserpin2 与胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、弹性蛋白酶和蛋白酶 K 以 1∶2质量比加入的处理组 Treatment groups with Bmserpin2 and trypsin, chymotrypsin, elastase and proteinase K added in 1∶2 mass ratio, respectively. 图中数据为平均值 ± 标准差；柱上双星号表示 OD_{436}值在处理组与对照组间差异极显著($P<0.01$, T 检验)。Data in the figure are mean ± *SD*, and double asterisk above bars indicates extremely significant difference in OD_{436} value between the treatment group and the control group ($P<0.01$, *T*-test).

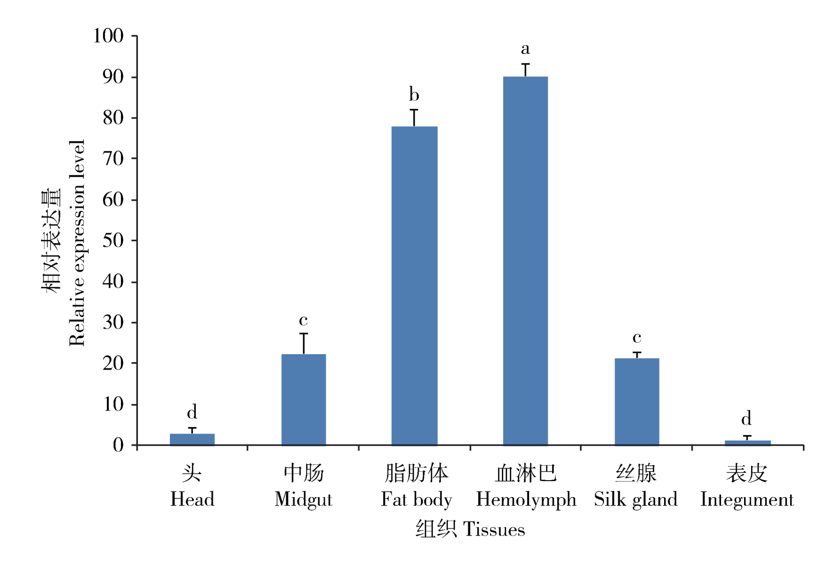


图 3　RT-qPCR 检测 *Bmserpin2* 在家蚕 5 龄幼虫不同组织中的相对表达量

Fig. 3　Relative expression levels of *Bmserpin2* in different tissues of the 5th instar larvae of *Bombyx mori* detected by RT-qPCR

图中数据为平均值 ± 标准误；柱上不同小写字母表示不同组织间基因相对表达量差异显著($P<0.05$, Duncan 氏多重比较检验法)。Data in the figure are mean ± *SE*. Different lowercase letters above bars indicate significant differences in the relative expression level of gene among different tissues ($P<0.05$, Duncan's multiple range test).

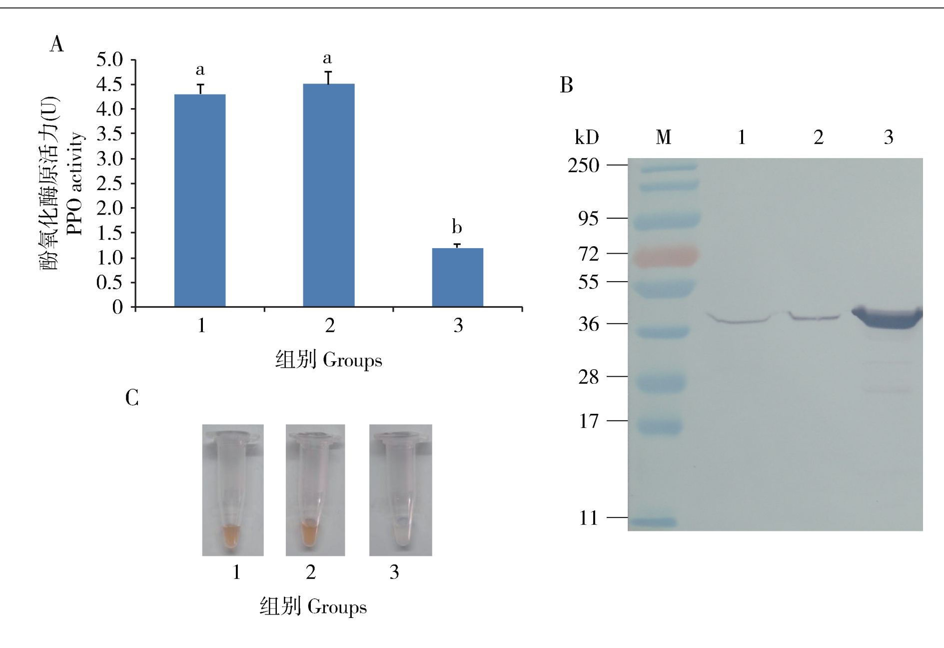


图 4 重组蛋白 Bmserpin2 对家蚕 5 龄幼虫血淋巴中酚氧化酶原活性的影响

Fig. 4 Effect of the recombinant Bmserpin2 on prophenol oxidase activity in the haemolymph of the 5th instar larvae of *Bombyx mori*

A：酶活性检测 Determination of enzymatic activity；B：血淋巴中蛋白的 Western blot 分析 Western blot assay for protein in the hemolymph；C：血淋巴黑化观察 Observation of hemolymph melanization. 1：不做任何处理的空白对照组 Blank control group without any treatment；2：注射等量 PBS 缓冲液的阴性对照组 Negative control group injected with an equal quantity of PBS buffer；3：注射 1.5 g 纯化的 Bmserpin2 蛋白的处理组 Treatment group injected with 1.5 g of purified Bmserpin2 protein；M：蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker. 图中数据为平均值 ± 标准误；柱上不同小写字母表示不同处理组间差异显著（$P < 0.05$，Duncan 氏多重比较检验法）。Data in the figure are mean ± *SE*. Different lowercase letters above bars indicate significant differences among different treatment groups ($P < 0.05$, Duncan's multiple range test).

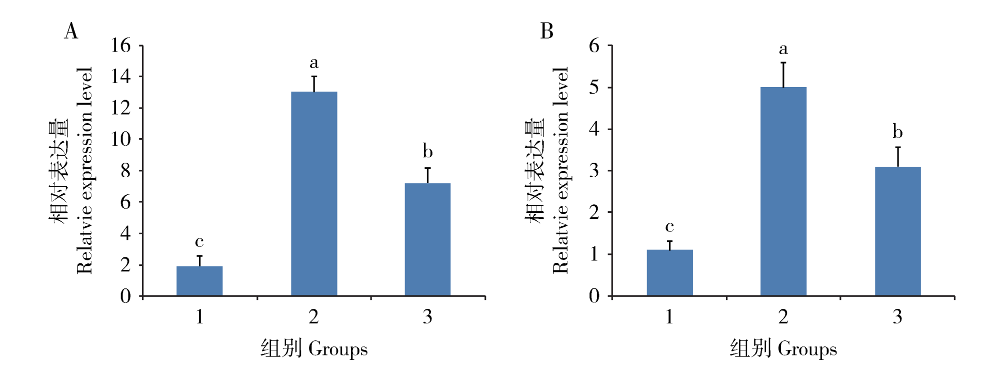


图 5 RT-qPCR 检测 Bmserpin2 蛋白对家蚕 5 龄幼虫血淋巴中抗菌肽基因 *gloverin*2（A）和 *moricin*（B）表达的影响

Fig. 5 Effect of the recombinant Bmserpin2 on the expression of antimicrobial peptide genes *gloverin*2 (A) and *moricin* (B) in the hemocytes of the 5th larvae of *Bombyx mori* detected by RT-qPCR

1：不做任何处理的空白对照组 Blank control group without any treatment；2：注射藤黄微球菌和 PBS 的阳性对照组 Positive control group injected with *Micrococcus luteus* and PBS；3：注射藤黄微球菌和 Bmserpin2 蛋白的实验组 Experimental group injected with *M. luteus* and Bmserpin2 protein. 图中数据为平均值 ± 标准误；柱上不同小写字母表示不同处理组间差异显著（$P < 0.05$，Duncan 氏多重比较检验法）。Data in the figure are mean ± *SE*. Different lowercase letters above bars indicate significant differences among different treatment groups ($P < 0.05$, Duncan's multiple range test).

3 讨论

昆虫已经进化出有效的先天免疫系统来抵御病原体和寄生虫的入侵（Lemaitre and Hoffmann, 2007）。抗菌肽的产生和黑化反应是体液免疫的两个关键反应，在黑腹果蝇中，当入侵的细菌或真菌被识别为非自身成分时，AMPs 的 mRNA 通过 TOLL 或免疫缺陷（immune deficiency, IMD）途径开始转录进行翻译反应。特别是，IMD 通路是由革兰氏阴性菌的识别激活的，而 TOLL 通路是由革兰氏阳性菌和真菌的识别激活（Imler, 2014）。与 NK-kB 因子

介导的途径不同，黑化反应是无脊椎动物另一种由酚氧化酶（phenoloxidase, PO）催化的普遍的防御机制，该酶由 PPO 蛋白水解转化后的活性构象（Jiang *et al.*, 1998）。

本实验通过 *Bmserpin2* 组织表达量特异性分析显示目的基因在血淋巴和脂肪体中表达量最高（图 3），而血淋巴和脂肪体是家蚕先天性免疫中的两个重要组织，暗示 *Bmserpin2* 与家蚕的先天性免疫相关。进一步实验通过将体外表达的重组 Bmserpin2 注射进家蚕幼虫后，检测血淋巴中的酚氧化酶原活性以及观察血淋巴黑化，结果显示 Bmserpin2 可以有效抑制 PPO 活性和血淋巴黑化（图 4）。有报道显示在果蝇中，Serpin27A（CG11331）、Serpin28D（CG7219）和 Serpin77Ba（CG6680）负调控 PPO 级联反应（De Gregorio *et al.*, 2002；Ligoxygakis *et al.*, 2003；Tang *et al.*, 2008），本实验结果与其他物种中 serpin 类似，推测家蚕 Bmserpin2 蛋白可以通过抑制 PPO 活性从而调控家蚕先天性免疫防御。同时有文献报道 serpin 与其对应的特异性的丝氨酸蛋白酶形成复合体，并且复合体是以共价键紧密结合（Bone *et al.*, 1987），但是本研究中未检测 Bmserpin2 与其他蛋白的结合物，推测 Bmserpin2 蛋白对于酚氧化酶原的抑制作用是非特异性结合。

进一步实验通过家蚕外源微生物诱导 AMPs，并注射重组 Bmserpin2 蛋白检测相关 AMPs 基因表达量，结果显示微球菌和 Bmserpin2 混合注射组中抗菌肽靶基因的转录表达被显著下调（图 5）。在果蝇中，Spn43Ac（necrotic, CG1857）和 Spn1（Spn42Dd, CG9456）负调控 TOLL 信号通路（Levashina *et al.*, 1999；Fullaondo *et al.*, 2011），而 TOLL 通路是由革兰氏阳性菌和真菌的识别激活（Imler, 2014），推测 Bmserpin2 蛋白是通过抑制抗菌肽基因的表达，从而调控家蚕自身免疫的 TOLL 通路。TOLL 通路中存在丝氨酸蛋白酶的参与，因此推测 Bmserpin2 也可能是通过抑制其通路中某些丝氨酸蛋白酶的活性从而抑制抗菌肽表达的产生。

研究发现，PPO 的激活和 TOLL 通路和是由细胞外剪切域丝氨酸蛋白酶级联介导的（Kambris *et al.*, 2006；An *et al.*, 2009）。在烟草天蛾 *Manduca sexta* 中，serpin1，serpin3，serpin4，serpin5，serpin6 和 serpin7 也被证实调控 PPO 活性和 TOLL 通路（Zhu *et al.*, 2003；Tong and Kanost, 2005；Zou and Jiang, 2005；An and Kanost, 2010；An *et al.*, 2011；Suwanchaichinda *et al.*, 2013）。在鞘翅目黄粉虫的幼虫同样也被证实一些 serpin 负调控 PPO 和 TOLL 通路（Jiang *et al.*, 2009, 2011）。

综上，本研究表明 Bmserpin2 可能参与家蚕酚氧化酶原激活和 TOLL 途径的胞外级联反应的免疫通路，并且使抗菌肽靶基因的转录表达下调。Bmserpin2 蛋白对由革兰氏阳性菌和真菌的识别激活的 TOLL 免疫通路以及调控抗菌肽的作用机理还需进一步研究。

参考文献（References）

Amparyup P, Charoensapsri W, Tassanakajon A, 2009. Two prophenoloxidases are important for the survival of *Vibrio harveyi* challenged shrimp *Penaeus monodon*. *Dev. Comp. Immunol.*, 33(2): 247–256.

An C, Ishibashi J, Ragan EJ, Jiang H, Kanost MR, 2009. Functions of *Manduca sexta* hemolymph proteinases HP6 and HP8 in two innate immune pathways. *J. Biol. Chem.*, 284(29): 19716–19726.

An C, Kanost M, 2010. *Manduca sexta* serpin-5 regulates prophenoloxidase activation and the TOLL signaling pathway by inhibiting hemolymph proteinase HP6. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 40(9): 683–689.

An C, Ragan E, Kanost M, 2011. Serpin-1 splicing isoform J inhibits the proSpätzle-activating proteinase HP8 to regulate expression of antimicrobial hemolymph proteins in *Manduca sexta*. *Dev. Comp. Immune.*, 35(1): 135–141.

Bone R, Shenvi AB, Kettner CA, Agard DA, 1987. Serine protease mechanism: structure of an inhibitory complex of alpha lytic protease and a tightly bound peptide boronic acid. *Biochemistry*, 26(24): 7609–7614.

De Gregorio E, Han SJ, Lee WJ, Baek MJ, Osaki T, Kawabata S, Lee BL, Iwanaga S, Lemaitre B, Brey PT, 2002. An immune-responsive serpin regulates the melanization cascade in *Drosophila*. *Dev. Cell*, 3(4): 581–592.

Fullaondo A, García-Sánchez S, Sanz-Parra A, Recio E, Lee SY, Gubb D, 2011. Spn1 regulates the GNBP3-dependent TOLL signaling pathway in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.*, 31(14): 2960–2972.

Gubb D, Sanz-Parra A, Barcena L, Troxler L, Fullaondo A, 2010. Protease inhibitors and proteolytic signalling cascades in insects. *Biochimie*, 92(12): 1749–1759.

Imler JL, 2014. Overview of drosophila immunity: a historical perspective. *Dev. Comp. Immunol.*, 42(1): 3–15.

Jiang H, Wang Y, Kanost MR, 1998. Pro-phenol oxidase activating proteinase from an insect, *Manduca sexta*: a bacteria-inducible protein similar to *Drosophila* easter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(21): 12220–12225.

Jiang HB, Wang Y, Gu YL, Guo XP, Zou Z, Scholz F, Trenczek TE, Kanost MR, 2005. Molecular identification of a bevy of serine proteinases in *Manduca sexta* hemolymph. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35: 931–943.

Jiang R, Kim EH, Gong JH, Kwon HM, Kim CH, Ryu KH, Park JW, Kurokawa K, Zhang J, Gubb D, Lee B, 2009. Three pairs of protease-serpin complexes cooperatively regulate the insect innate immune responses. *J. Biol. Chem.*, 284(51): 35652 – 35658.

Jiang R, Zhang B, Kurokawa K, So YI, Kim EH, Hwang H, Lee JH, Shiratsuchi A, Zhang J, Nakanishi Y, Lee HS, Lee B, 2011. 93-kDa twin-domain serine protease inhibitor (serpin) has a regulatory function on the beetle TOLL proteolytic signaling cascade. *J. Biol. Chem.*, 286(40): 35087 – 35095.

Kambris Z, Brun S, Jang IH, Nam HJ, Romeo Y, Takahashi K, Lee WJ, Ueda R, Lemaitre B, 2006. *Drosophila* immunity: a large-scale in vivo RNAi screen identifies five serine proteases required for TOLL activation. *Curr. Biol.*, 16(8): 808 – 813.

Kanost MR, 1999. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. *Dev. Comp. Immunol.*, 23(4 – 5): 291 – 301.

Lemaitre B, Hoffmann J, 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol.*, 25: 697 – 743.

Levashina E, Langley E, Green C, Gubb D, Ashburner M, Hoffmann J, Reichhart J, 1999. Constitutive activation of TOLL-mediated antifungal defense in serpin-deficient *Drosophila*. *Science*, 285 (5435): 1917 – 1919.

Li B, Ye CJ, Meng Y, Fan T, Chen FS, 2016. Prokaryotic expression of *Bombyx mori* serine protease inhibitor Bmserpin6 and its regulation on prophenoloxidase activity and antimicrobial peptide expression. *Sci. Seric.*, 42(2): 237 – 242. [李冰, 叶崇军, 孟艳, 范涛, 陈复生, 2016. 家蚕丝氨酸蛋白酶抑制剂 Bmserpin 6 的原核表达及对酚氧化酶原活性和抗菌肽表达的调控作用. 蚕业科学, 42 (2): 237 – 242]

Li B, Yu HZ, Ye CJ, Ma Y, Li X, Fan T, Chen FS, Xu JP, 2017. *Bombyx mori* Serpin6 regulates prophenoloxidase activity and the expression of antimicrobial proteins. *Gene*, 610: 64 – 70.

Ligoxygakis P, Pelte N, Ji C, Leclerc V, Duvic B, Belvin M, Jiang H, Hoffmann J, Reichhar JM, 2003. A serpin mutant links TOLL activation to melanization in the host defence of *Drosophila*. *EMBO J.*, 21(23): 6330 – 6337.

Li J, Ma L, Lin Z, Zou Z, Lu Z, 2016. Serpin-5 regulates prophenoloxidase activation and antimicrobial peptide pathways in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 73: 27 – 37.

Liu D, Wang L, Yang L, Qian C, Wei G, Dai L, Li J, Zhu B, Liu C, 2015. Serpin-15 from *Bombyx mori* inhibits prophenoloxidase activation and expression of antimicrobial peptides. *Dev. Comp. Immunol.*, 51(1): 22 – 28.

Narumi H, Hishida T, Sasaki T, Feng DF, Doolittle R, 1993. Molecular cloning of silkworm (*Bombyx mori*) antichymotrypsin. A new member of the serpin superfamily of proteins from insects. *Eur. J. Biochem.*, 214(1): 181 – 187.

Reichhart JM, 2005. Tip of another iceberg: *Drosophila* serpins. *Trends Cell Biol.*, 15(2): 659 – 665.

Sumathipala N, Jiang H, 2010. Involvement of *Manduca sexta* peptidoglycan recognition protein-1 in the recognition of bacteria and activation of prophenoloxidase system. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 40(6): 487 – 495.

Suwanchaichinda C, Kanost MR, 2009. The serpin gene family in *Anopheles gambiae*. *Gene*, 442(1): 47 – 54.

Suwanchaichinda C, Ochieng R, Zhuang S, Kanost M, 2013. *Manduca sexta* serpin-7, a putative regulator of hemolymph prophenoloxidase activation. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 43(7): 555 – 561.

Tang H, Kambris Z, Lemaitre B, Hashimoto C, 2008. A serpin that regulates immune melanization in the respiratory system of *Drosophila*. *Dev. Cell*, 15(4): 617 – 626.

Tong Y, Kanost M, 2005. *Manduca sexta* serpin-4 and serpin-5 inhibit the prophenol oxidase activation pathway: cDNA cloning, protein expression, and characterization. *J. Biol. Chem.*, 280 (15): 14923 – 14931.

Tripathi LP, Sowdhamini R, 2008. Genome-wide survey of prokaryotic serine proteases: analysis of distribution and domain architectures of five serine protease families in prokaryotes. *BMC Genomics*, 9(1): 549.

Xiong GH, Xing L, Lin Z, Saha T, Wang C, Jiang H, Zou Z, 2015. High throughput profiling of the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* immunotranscriptome during the fungal and bacterial infections. *BMC Genomics*, 16(1): 321.

Yonemura N, Sehnal F, Konik P, Ajimura M, Tamura T, Mita K, 2012. Conservation of a pair of serpin 2 genes and their expression in Amphiesmenoptera. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 42(5): 371 – 380.

Zha HX, Liu G, Zhang C, Wang YY, Wei ZG, Li B, Chen YH, Xu YX, Shen WD, 2011. Cloning, prokaryotic expression and preparation of polyclonal antibody of serine protease inhibitor 4 (serpin-4) from *Bombyx mori*. *Acta Entomol. Sin.*, 54(6): 642 – 647. [查宏贤, 刘罡, 张晨, 王彦云, 卫正国, 李兵, 陈玉华, 许雅香, 沈卫德, 2011. 家蚕丝氨酸蛋白酶抑制剂 4(serpin-4)的基因克隆、原核表达和多克隆抗体制备. 昆虫学报, 54(6): 642 – 647]

Zhu Y, Wang Y, Gorman M, Jiang H, Kanost M, 2003. *Manduca sexta* serpin-3 regulates prophenoloxidase activation in response to infection by inhibiting prophenoloxidase-activating proteinases. *J. Biol. Chem.*, 278(47): 46556 – 46564.

Zou Z, Jiang H, 2005. *Manduca sexta* serpin-6 regulates immune serine proteinases PAP-3 and HP8 – cDNA cloning, protein expression, inhibition kinetics, and function elucidation. *J. Biol. Chem.*, 280 (14): 14341 – 14348.

Zou Z, Zhao PC, Weng H, Mita K, Jiang H, 2009. A comparative analysis of serpin genes in the silkworm genome. *Genomics*, 93(4): 367 – 375.

(责任编辑: 马丽萍)